

Aus dem Staatlichen Medizinaluntersuchungsamt Fulda
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Krüpe)

Untersuchungen über die erblichen Isoenzym-Typen
der Phosphoglukomutase (PGM₁) und der
Sauren Erythrozytenphosphatase (SEP) an Erythrozyten
von Anaemie-Patienten, von Gesunden, aus
Blutkonserven und nach enzymatischer Vorbehandlung
sowie Erhebung populationsgenetischer Daten für
Osthessen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Reinhold Schwarz
aus Brackenheim/Württ.

Marburg 1972

Druck: Görlich & Wettershäuser, Marburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0044

Aus dem Staatlichen Medizinaluntersuchungsamt Fulda
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Krüpe)

Untersuchungen über die erblichen Isoenzym-Typen
der Phosphoglukomutase (PGM₁) und der
Sauren Erythrozytenphosphatase (SEP) an Erythrozyten
von Anaemie-Patienten, von Gesunden, aus
Blutkonserven und nach enzymatischer Vorbehandlung
sowie Erhebung populationsgenetischer Daten für
Osthessen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Reinhold Schwarz

aus Brackenheim/Württ.

Marburg 1972

Druck: Görlich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 28. November 1972

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. M. Krüpe

Correferent: Prof. Dr. G. G. Wendt

I. Einleitung

A)	Allgemeine Einführung über Polymorphismen	4
B)	Aspekte der Arbeit und Themenstellung	4
1.	Anwendung der Agargel-Elektrophorese für die Darstellung der PGM ₁ -Typen	4
2.	Verhalten bei Blutproben von Anaemiepatienten	5
3.	Einfluß von Lagerung, Konservierung und Enzymeinwirkung	5
4.	Untersuchungen an Mutter-Kind Paaren	5
5.	Populationsgenetik	5
C)	Forschungsgeschichtlicher Überblick zu dem Problem	5
D)	Charakterisierung der untersuchten Enzyme	7
1.	Funktion im Stoffwechsel	7
2.	Enzymnachweise	8
3.	Genetik	9

II. Material und Methoden 12

A)	Herkunft, Aufbewahrung und Behandlung ausgewählter Proben	12
1.	Populationsgenetik	12
2.	Anaemien	12
3.	Haltbarkeit	12
4.	Fermenteinwirkung auf die Erythrozytenoberfläche	13
5.	Mutter-Kind Paare	14

B) Verfahren zur Auftrennung der Isoenzyme	14
1. Herstellung des Hämolysates und der Verdünnungsreihen	15
2. Technik der Agargel-Elektrophorese zur Darstellung der PGM ₁ -Typen	15
a) Erforderliche Geräte	15
b) Die Pufferlösungen	16
c) Gelbereitung	17
d) Auftragen des Hämolysates	17
e) Die Elektrophorese	18
f) Färbung der Fraktionen auf Grund ihrer Reaktion mit dem Substrat	18
g) Dokumentation	19
3. Technik der Stärkegel-Elektrophorese zur Darstellung der SEP-Typen	20
a) Erforderliche Geräte	20
b) Die Pufferlösungen	20
c) Gelbereitung	21
d) Ausführung der Elektrophorese	21
e) Färbung der Fraktionen auf Grund ihrer Reaktion mit dem Substrat	22
III. Ergebnisse	23
A) Methoden der Isoenzymdarstellung	23
B) Untersuchungen am Blut Anaemiekranker	23
C) Haltbarkeitsuntersuchungen	25
1. ACD-stab. Blut	25
2. "Bio-Test"-Zellen	26
3. Enzymtests zur Veränderung der Membranoberfläche	26

D) Mutter-Kind-Typenvergleiche	26
E) Populationsgenetik	28
1. Frauen und Männer gesondert	28
2. Gesamtaufstellung	29
IV. Besprechung	30
A) Besondere Eigenschaften der Darstellung des PGM ₁ -Isoenzym polymorphismus durch die Agarose-Elektrophorese	30
B) Beurteilung der Beobachtungen bei der Untersuchung des Blutes Anaemiekranker	30
C) Haltbarkeitsunterschiede der Enzymtypen unter den gegebenen Bedingungen	31
D) Beitrag von 79 Mutter-Kind Paaren zu Resultaten anderer Autoren	32
E) Typenverteilung der SEP- und PGM ₁ -Isoenzyme im Vergleich mit Untersuchungen in anderen Teilen Deutschlands und Europas	35
V. Zusammenfassung	38
VI. Literaturverzeichnis	40

I. Einleitung

A) Allgemeine Einführung über Polymorphismen

Der bunten Vielgestaltigkeit alles Lebenden, wie wir es täglich beobachten können, entspricht ein großer Variantenreichtum auf allen Ebenen seiner Struktur. Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, daß sich die Eigenart des Menschen bis auf seine molekularen Bausteine zurückverfolgen läßt. Nach der Entdeckung zellgebundener Blutgruppenmerkmale werden mehr und mehr Makromoleküle gefunden, die bei verschiedenen Menschen in qualitativ unterschiedlichen Formen vorkommen und die genetisch determiniert sind. Die große Zahl dieser polymorphen Merkmalssysteme erlaubt es fast, von einer "Molekularen Individualität" zu sprechen, zumal zu erwarten ist, daß sich ein noch weiteres Spektrum an Varianten eröffnet; denn erst ein kleiner Teil aller bekannten Polysaccharide, Proteine und Enzymsysteme, die im menschlichen Organismus vorhanden sind, ist auf ähnliche Unterschiede untersucht worden (6).

Jeder einzelne dieser Polymorphismen stellt Aufgaben, die sich von methodischen bis zu populationsgenetischen Problemkreisen erstrecken.

B) Aspekte der Arbeit und Themenstellung

Diese Arbeit befaßt sich im Besonderen mit den Isoenzymmustern der Erythrozytenphosphoglukomutase (PGM_1) und der sauren Erythrozytenphosphatase (SEP) unter den folgenden Gesichtspunkten:

1. Anwendung der Agargel-Elektrophorese für die Darstellung der PGM_1 -Typen

Überprüfung und Beurteilung des Verfahrens zur routinemäßigen Darstellung der PGM_1 -Typen mittels der Elektrophorese im Agargel auf den Grundlagen der Beschreibung von MONN (51), sowie dessen Dokumentation im Vergleich zur Stärkegel-Elektrophorese.

2. Verhalten der Blutproben von Anaemiepatienten

Semi-quantitative Untersuchungen über die Isoenzymkonzentration an Hand von Verdünnungsreihen. Die Literatur gibt einige Beispiele von Aktivitätsänderungen in verschiedenen Enzymsystemen (10, 12, 13, 30, 47, 56, 60, 73, 76).

3. Einfluß von Lagerung, Konservierung und Enzymeinwirkung

Nachweis in Blutproben, die in verschiedenen Konservierungsmedien unterschiedlich lange gelagert und die dem Einfluß verschiedener membranaktiver Enzyme ausgesetzt waren.

Bei diesen Untersuchungen erwarteten wir Aufschluß über die Haltbarkeit und Stabilität der Erythrozytenenzyme unter definierten Bedingungen (s. auch 68, 70).

4. Untersuchungen an Mutter- Kind Paaren

Die Ergebnisse sollen einen Beitrag zur Formalgenetik dieser Merkmale leisten.

5. Populationsgenetik

Populationsgenetische Erhebung in Osthessen.

Dieses Gebiet Deutschlands ist bisher nur wenig auf andere Polymorphismen untersucht worden (38).

C) Forschungsgeschichtlicher Überblick zu dem Problem

Die Phosphoglukomutase (PGM) ist ein Zellenzym, das die reversible Phosphorolyse von Reservekohlenhydrat katalysiert und so ein wichtiges Glied im Glykogenstoffwechsel darstellt (9). Es wurde 1939 von CORI, COLOWICK und CORI entdeckt (11). 1948 gelang NAJJAR die Kristallisation des Enzyms aus Kaninchenmuskulatur (54, 55).

Er stellte 1954 zusammen mit PULLMANN eine Theorie zum Wirkungsmechanismus auf, die in den folgenden Jahren verschiedene Modifikationen erfuhr (19, 55).

Den Polymorphismus der PGM klärten 1964 HOPKINSON et al. (30, 31) auf und trennten das Isoenzymgemisch unter Verwendung der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES (71, 72) in die sieben Fraktionen a, b, c, d, e, f. Aufgrund weiterer Untersuchungen nahmen 2 Jahre später die selben Autoren drei unabhängig voneinander vererbare PGM-Systeme an und entwarfen ein Genmodell von drei autosomalen Loci für die Strukturgene $PGM_{1,2,3}$ mit den Isoenzymfraktionen a - k (32, 34), das durch viele formal- und populationsgenetische Untersuchungen bestätigt wurde (6).

1968 führte MONN (51) die Agargel-Elektrophorese zur Auftrennung der PGM-Isoenzyme ein. Trotz der Vorteile, die diese Methode gegenüber der Stärkegel-Elektrophorese bietet, hat sie bisher wenig allgemeine Anwendung gefunden.

Die Phosphatasen kommen im Organismus entsprechend ihrer Funktion der hydrolytischen Spaltung von Phosphorsäuren ubiquitär vor. Nach ihrem Wirkungsoptimum in verschiedenen pH-Bereichen werden sie in "saure" und "alkalische" Phosphatasen eingeteilt (8, 78).

MARTLAND et al. berichteten 1924 über Phosphataseaktivität in roten Blutzellen (44). Untersuchungen zur Substratspezifität und unterschiedlichen Aktivatoren und Inhibitoren grenzten die saure Erythrozytenphosphatase (SEP) gegen saure Phosphatasen anderer Herkunft ab (1, 8, 78, 83).

1963 gelang es HOPKINSON et al. die SEP mit Hilfe der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES in ihre Isoenzymproteine aufzutrennen, die sie nach abnehmender Wanderungsgeschwindigkeit A, B und C nannten, und

Ebenso sind hormonale Einflüsse nachgewiesen worden (24). Das Insulin wirkt im Sinne einer Hemmung, das Adrenalin einer Aktivierung des Enzyms. Als Zwischensubstanzen des Krebs-Zyklus haben Citrat und Isocitrat einen inhibitorischen Effekt auf die PGM-Aktivität durch Bindung des Aktivatorions Mg^{2+} . Es besteht so ein negativer feed-back zu einem wichtigen Schritt des Embden-Meyerhoff-Weges (83).

Die Phosphatasen spalten Phosphatesterbindungen mit relativ geringer Substratspezifität aber unterschiedlicher Hydrolysegeschwindigkeit. So zeichnet sich die saure Erythrozytenphosphatase durch hohe Spaltungsgeschwindigkeit des α -Isomeren des Glycerophosphats und des D(-) Isomeren aus einem racemischen Gemisch der Phosphomandelsäure aus (78).

Die SEP benötigt zur Entfaltung ihrer vollen Wirksamkeit die Anwesenheit von Mg^{2+} , während sie durch Cu^{2+} , Fe^{2+} , F^{-} und L(+)-Weinsäure gehemmt wird (78).

Aktivitätsänderungen bei pathologischen Prozessen werden zur Diagnosestellung ausgenutzt (47).

2. Enzymnachweise

Die Phosphoglukomutase (PGM) läßt sich durch Kopplung an die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase als Indikatorsystem färberisch darstellen. In Gegenwart von Gluc.-1-P- und geringen Mengen Gluc.-1,6-P₂ entsteht Gluc. 6-P, das unter Katalyse der Gluc. 6P-DH mit NADPH (Nicotinamid-adenin-dinucleotid) als Coenzym zu 6-Phosphogluconat wird. NADP reduziert MTT (Dimethylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium-bromid) in Gegenwart von PMS (Phenazin-methosulfat), das als Elektronenträger fungiert, so daß unlösliches, blaues Formazan an den Stellen der PGM-Aktivität ausfällt (s. Abb. 1).

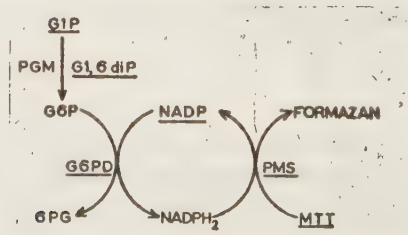


Abb. 1: Reaktionskette zum Enzymnachweis (74).

Phenolphthalein-Diphosphat wird von der sauren Erythrozyten-phosphatase (SEP) dephosphoryliert zu Phenolphthalein, das an Stellen der SEP-Aktivität im Stärkegel bei basischem Milieu eine rote Färbung annimmt (29).

3. Genetik

Wesentliches Charakteristikum der zu untersuchenden Isoenzyme ist ihre Vererbung nach den Mendelschen Gesetzen.

Elektrophoreseuntersuchungen legen nahe, daß Gene an drei unterschiedlichen loci - PGM_1 , PGM_2 , PGM_3 - die Isoenzymstruktur der Phosphoglukomutase im Sinne eines einfachen, kodominanten Erbganges determinieren (32, 34, 50). So resultieren drei Isoenzymsätze, die voneinander weitgehend unabhängige genetische Variabilitäten zeigen. An dem Genort PGM_1 , dem die Fraktionen a, b, c, d zuzuordnen sind, kommen die Allele PGM_1^1 und PGM_1^2 vor. Beim homozygoten Phänotypen PGM_1 1-1 beobachten wir die Fraktionen a+c, PGM_1 2-2 die Banden b+d, während im heterozygoten Falle (PGM_1 2-1) alle 4 Isoenzyme vertreten sind (s. Abb. 2).

Verschiedene seltene Phänotypen, die seither entdeckt wurden, unterstellte man den Allelen PGM_1^3 bis PGM_1^8 . Ihre Häufigkeit liegt Angaben aus der Literatur zufolge jedoch nicht über 5 in 10 000 (33, 36, 43, 49).

Aufgrund einer beschriebenen Mutter-Kind-Inkompatibilität werden die Allele PGM_1^0 diskutiert (80). Die Isoenzymfraktionen e, f, g, die in der Bevölkerung Westeuropas nahezu unverändert sind, stehen unter der Kontrolle des Genorts für PGM_2 . Sehr seltene Phänotypen haben aber auch hier die Möglichkeit mehrerer Allele wahrscheinlich gemacht (33).

Die Isoenzyme der loci PGM_1 und PGM_2 sind für den größten Teil menschlicher Phosphoglukomutasen verantwortlich.

Auf dem locus PGM_3 mit seinen zwei Allelen PGM_3^1 und PGM_3^2 , zu denen die Fraktionen h, i, j und k gehören, entfallen 0,4 %. Diese haben sich aber in Erythrozyten nicht nachweisen lassen; sie stellen sich am besten aus Homogenisaten von Fibroblastenkulturen dar (40, 45). Es hat sich herausgestellt, daß die Genorte PGM_1 , PGM_2 und PGM_3 nicht miteinander verknüpft sind (34, 57).

Die Thermostabilität der Isoenzyme nimmt ab von $PGM_2 > PGM_1 > PGM_3$. Auch scheint eine quantitative Abstufung der Aktivitäten vorzuliegen (46, 69).

Die Lokalisation der PGM-loci auf den Chromosomen ist bisher nicht bekannt; auch über Kopplung mit anderen Genen weiß man nichts (34, 42).

Enzymdefekte sind nicht bekannt geworden. Es muß aber bis zur massenstatistischen Widerlegung mit dem Vorkommen von stummen Genen in heterozygoter Anlage gerechnet werden (35, 15).

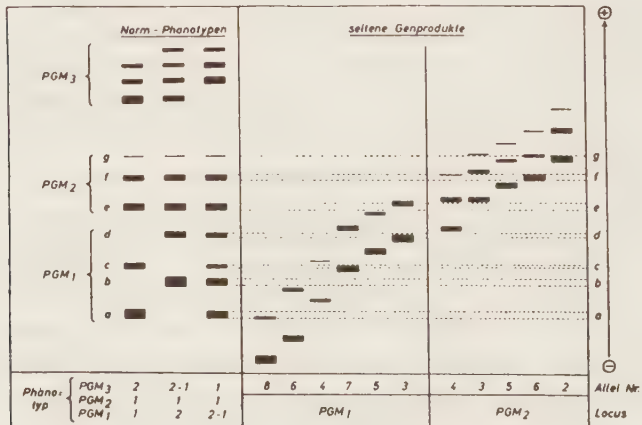


Abb. 2: Schematische Darstellung dreier verschiedener Normtypen. Die Kombination der PGM_1 -Typen mit den PGM_2 -Typen wurde willkürlich gewählt. Jede Typenkombination kommt vor. Um eine Zuordnung seltener Genprodukte zu erleichtern, wurden Fluchtlinien, entsprechend der Lage der Normisoenzyme, gezogen. Nach BRINKMANN (6).

Die Isoenzyme der sauren Erythrozyten-Phosphatase (SEP) werden von 3 kodominanten Allelen eines autosomalen locus - Ph^A , Ph^B , Ph^C - kontrolliert (21, 39). Die 6 möglichen Phänotypen sind charakterisiert durch die Fraktionen A, AB, AC, B, BC, C. Sie unterscheiden sich nicht nur durch die elektrophoretische Beweglichkeit ihrer Isoenzyme, sondern auch in der relativen Intensität der vorhandenen Komponenten. Die drei Allelen verursachen auch unterschiedliche quantitative Effekte im Sinne $Ph^C > Ph^B > Ph^A$ (18, 31, 64).

Die genetisch gesteuerten Polymorphismen beider Enzyme (SEP und PGM) haben große Bedeutung in der forensischen Medizin erlangt (27). Die isolierten Ausschlußchancen für Nichtväter betragen 14 % im PGM- und 24,6 % im SEP-System (14, 17, 18, 35).

Auch in populationsstatistischen Erhebungen finden die verschiedenen Genverteilungen Berücksichtigung (6, 61).

II. Material und Methoden

A) Herkunft, Aufbewahrung und Behandlung ausgewählter Proben

Je nach beabsichtigter Untersuchung stammten die Blutproben aus verschiedenen Quellen.

1. Zur populationsgenetischen Erhebung verwandten wir Proben von Blutspendern, aus dem serologischen Labor des Staatlichen Medizinaluntersuchungsamtes Fulda, von Schwangeren und freiwilligen Probanden, die im Raume Osthessen beheimatet waren. Mit Ausnahme des Spenderblutes, das in ACD-Stabilisator konserviert war, handelte es sich um Citrat-Vollblut, dessen Alter nicht höher als eine Woche war, bis es zur Analyse kam. So lange blieb es im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.
2. Die Blutproben Anaemiekranker - es handelte sich um Megaloblastenanaemien - wurde nach Hb-Gehalt ausgewählt, der unter 10mg/100ml liegen sollte. Citrat verhinderte die Gerinnung. Bis zur Elektrophorese - in der Regel drei Tage nach Entnahme - verblieben die Proben im Kühlschrank bei 4° C.

Im einzelnen wurden bei den Patienten folgende Diagnosen angegeben:

18 chronisch Leberkranke, 12 Schwangere mit Folsäuremangel, 7 perniziöse Anaemien, 5 Patienten mit Magentumoren, 7 Leukaemiker und 4 Säuglinge mit Avitaminosen.
3. Die Beobachtungen zur Haltbarkeit der Erythrozyten und ihrer Enzyme wurden unter verschiedenen Gesichtspunkten angestellt.

Konserven zur Bluttransfusion kamen 7, 10, 14, 20, 23, 30 und 40 Tage nach Entnahme zur Untersuchung. Die Erythrozyten blieben hier durch Zusatz von ACD-Stabilisator ca. 21 Tage haltbar.

1000 ml dieser ACD-Lösung enthalten

13,2 g Natrium citricum neutrale · H₂O

4,4 g Acidum citricum

14,7 g Saccharum amylaceum

gelöst in aqua pro injectione.

Außerdem untersuchte ich kommerziell hergestellte Testblutzellen der Firma "Biotest" Frankfurt/M., die in eine besondere Konservierungsflüssigkeit eingebracht sind und für Agglutinationsprüfungen mindestens 3 - 4 Wochen benutzt werden können.

Die Enzymtypen waren bekannt.

30, 60, 90 und 100 Tage alte Blutproben kamen hier zur Analyse.

Wir untersuchten von jeder Altersstufe mindestens 5 Proben, deren Typ in der Regel schon vorher bestimmt war.

4. Fermenteinwirkung auf die Erythrozytenoberfläche

5 Blutproben, die ebenfalls von Konserven stammten, wurden je in vier Portionen geteilt. Zwei davon wurden mit Neuraminidase bzw. Papain versetzt, eine nur mit NaCl aufgeschwemmt, und die vierte diente für die Typenbestimmung in der Routinemethode.

Im einzelnen verfahren wir folgendermaßen:

Je 0,4 ml 3x gewaschene Erythrozyten werden mit Papain- bzw. Neuraminidaselösung 15 Min. im Wasserbad bei 37° C inkubiert, danach wiederum gewaschen und zur Elektrophorese hämolysiert.

Bereitung der Papain-Lösung:

1 g Papain "Merck 1 : 350" mörsern, 10 ml 1/10 n - HCl zugeben, 24 Std. im Kühlschrank bei 6° C stehen lassen, 20 Min. scharf zentrifugieren und den Überstand weiterverwenden. Zur Herstellung von 10 ml Gebrauchslösung werden 0,2 ml des Überstandes mit 1,8 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) und 8,0 ml 0,85 %iger NaCl gut gemischt. Dieses Gemisch ist nur einen Tag haltbar.

Bereitung der Neuraminidase-Lösung:

Gefriergetrocknetes "Receptor Destroying Enzyme" (Behringwerke AG) wird in 0,05 ml Natriumacetat-Essigsäurepuffer unter Zusatz von 0,9 g/100 ml NaCl und 0,1 g/100 ml CaCl₂ gelöst und auf 10 ml mit NaCl-Lösung aufgefüllt (27).

5. Die Proben der Mutter-Kind Paare stammten teils aus Vaterschaftsgutachten, teils aus dem serologischen Labor des Staatlichen Medizinaluntersuchungsamtes Fulda. Insgesamt untersuchten wir 79 Paare, davon 52 "kritische", d. h., die Mutter ist homozygot, im PGM₁- und 34 "kritische" im SEP-System.

B) Verfahren zur Auftrennung der Isoenzyme

Bei der Auftrennung der Isoenzymgemische PGM und SEP legten wir die Arbeitsvorschriften von MONN, HOPKINS et al., HARRIS et al. und RADAM et al. zu Grunde, die wir jedoch zum Teil modifizieren mußten, um bei unseren Voraussetzungen optimale Ergebnisse zu erzielen (6, 7, 16, 22, 29, 35, 36, 49, 62, 67, 74).

1. Herstellung des Hämolysates und der Verdünnungsreihen

Da sowohl die PGM wie auch die SEP Zellenzyme sind, d. h. sie befinden sich im Erythrozyten, muß der Elektrophorese eine Hämolyse vorausgehen. Zu diesem Zweck werden die Erythrozyten 3 x mit 0,85 %iger NaCl gewaschen und möglichst ohne Flüssigkeit für mindestens 4 Std. einer Temperatur von -20°C ausgesetzt. Wo erforderlich, verdünnten wir das Hämolysat mit aqua bidest. bis zu 32fach in geometrischer Progression.

2. Technik der Agargel-Elektrophorese zur Darstellung der PGM₁-Typen

1968 beschrieb MONN (51) ein Verfahren zur Typenidentifizierung der PGM₁, in dem er statt der bisher üblichen Stärkegel-Elektrophorese (HARRIS (29)) ein Agargel zur Auftrennung der Fraktionen anwendete. Er wies dabei auf die folgenden Vorteile der neuen Methode hin:

- nur kleine Blutmenge erforderlich,
- wesentlich kürzere Elektrophoresedauer,
- geringere Kosten durch Materialersparnis,
- Möglichkeit bei Zimmertemperatur arbeiten zu können.

Wir können noch den Vorzug der einfachen Dokumentation hinzufügen (s. u.).

a) Erforderliche Geräte

Die Elektrophoresekammer (Universalkammer nach Kohn der Firma Shandon) wird von dem Netzgerät WTW-GT 500 mit konstant zu haltendem Gleichstrom gespeist. Als Gelträger verwenden wir eine Glasplatte 200 x 100 x 2 mm, deren Abmessungen es erlauben, 24 Proben gleichzeitig zu untersuchen.

Es erwies sich verfahrensmäßig als einfacher und weniger störanfällig, eine solide Glasplatte zu nehmen, als mehrere Objektträger.

Als Pufferbrücken dienten Fließpapierstreifen (Schleicher und Schüll Nr. 2527 in Bögen, zu denen passende Polyäthylenfolien ausgeschnitten werden); die Probengruben stanzen wir mit $5 \times 2,5$ mm Filterpapierplättchen (Whatman Nr. 3) ins Gel.

In Übereinstimmung mit MONN und KNEIPHOF (36, 51) erzielten wir schärfere Auftrennung, wenn wir die Elektrophorese im Kühlschrank bei 4°C und nicht bei Zimmertemperatur laufen ließen.

b) Die Pufferlösungen

Drei verschiedene Puffer finden Verwendung:

1. Als optimaler Brückenpuffer hat sich eine Dikaliumhydrogenphosphat-Natriumdihydrogenphosphatlösung erwiesen.

Für 5000 ml Puffer benötigen wir 6,35 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ und 1,52 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, das in 4800 ml aqua dest. aufgefüllt wird.

2. Eine auf die halbe Konzentration verdünnte Lösung des Brückenpuffers wird als Gel-puffer verwandt.

3. Als Substratpuffer hat sich der Tris-Puffer bewährt. Dazu lösten wir 0,9 g Tris - (hydroximethyl) - aminomethan in 220 ml aqua dest., stellten den pH mit 1 n HCl auf 8,0 ein und füllten auf zu 250 ml mit aqua dest.

c) Gelbereitung

Die Auftrennung erfolgte im 1 %igen Agargel, wobei wir darauf achteten, Unterschiede in einzelnen Agarlieferungen, die bei der Fertigung auftreten können, auszugleichen.

Wir ließen 250 mg Agar purum (Behringwerke) in 25 ml Gelpuffer etwa 10 Min. quellen und brachten die Suspension vorsichtig über der Bunsenflamme in Lösung. Zu langes Kochen ist dabei zu vermeiden, damit nicht zu viel Flüssigkeit durch Verdunstung verloren geht. Die auf 37° C vorgewärmte, gut gereinigte Glasplatte wird auf einem Nivelliertisch (Shandon) waagrecht ausgerichtet und mit dem heißen Agargel übergossen. Mit einem Glasstab kann man die Agarschicht vorsichtig bis an die Ränder der Glasplatte heranziehen. Sollte der Agar jedoch über den Rand herauslaufen, wird die Platte unbrauchbar.

Um das Austrocknen des Gels zu vermeiden, wird die fertige Platte in einer feuchten Kammer aufbewahrt; sie ist frühestens 12 Std. später einsatzbereit, sollte aber auch nicht älter als 2 Tage werden.

d) Auftragen des Hämolysates

Zur Aufnahme des Hämolysates stanzen wir mit Fließpapierplättchen (2,5 x 5 mm) feine Grübchen in die Längsseite der Agarplatte 20 mm vom Rand entfernt; ein solcher Streifen wird auch an den Breitseiten freigelassen.

Nachdem sich die Filterpapierplättchen mit Wasser vollgesogen haben, werden sie entfernt. Die zurückbleibenden Schlitzte füllt man mittels fein ausgezogener Glaskapillaren randvoll mit Hämolysat.

e) Die Elektrophorese

Nach Einfüllen von je 500 ml Brückenpuffer in die luftdicht abgeschlossenen Elektrodenkammern wird die Glasplatte in die Kammer eingesetzt, und zwar so, daß die Startreihe anodenseitig liegt. Die Plexiglas-Träger für die Fließpapierbrücken sollen mit Agarrand bündig abschließen. Die Verbindung mit dem Puffer stellt man her durch doppelte Lagen Fließpapier, die jeweils einen 10 mm breiten Agarrand bedecken. Nur über die Papierstreifen legt man eine passende Polyäthylenfolie, um deren Austrocknen zu vermeiden. Die Elektrophorese wird im Kühlschrank bei 4° C durchgeführt. Dabei laufen die Enzymfraktionen kathodenwärts, voran das Hämoglobin. Die Stromstärke wird konstant auf 17 mA eingestellt, um übermäßiges Erwärmen und demzufolge Verdunsten des Gelwassers zu vermeiden. Nach 2 3/4 - 3 Std. Laufzeit sollte die Hb-Fraktion 5 - 6 cm gelaufen sein. Nun kann die Elektrophorese abgebrochen werden, da eine bessere Auftrennung nicht mehr zu erwarten ist.

f) Färbung der Fraktionen auf Grund ihrer Reaktion mit dem Substrat

Das mit den PGM-Isoenzymen reagierende Substratgemisch hat folgende Zusammensetzung:

In 5 ml Trispuffer, der auf pH 8,0 eingestellt ist, löst man

0,0375 g Glucose-1-phosphat-di-Kaliumsalz
(Boehringer)

0,0025 g β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
(NADP-Boehringer)

0,0025 g Phenazin-methosulfat (PMS-Serva)

0,0025 g Dimethylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium-
bromid (MTT-Serva)

0,050 g Magnesiumsulfat

und bewahrt das jedesmal frisch zu bereitzende Gemisch bis zur alsbaldigen Verwendung im Kühlschrank auf.

Ist die Elektrophorese abgeschlossen, wärmt man die Agarplatte im Brutschrank an und bereitet ein Agargel vor (250 g Agar-Noble in 10 ml Tris-Puffer zum Kochen bringen) in das, wenn es mit weiteren 10 ml Puffer auf 40° C abgekühlt ist, das Substratgemisch und 0,015 ml Glucose-6-phosphat-dehydrogenase gemischt werden. Das Ganze wird sofort gleichmäßig über die warme Agarplatte verteilt. Um der nun ablaufenden Reaktion optimale Bedingungen zu schaffen, wird die Platte für 1 - 1 1/2 Std. bei 37° C und lichtgeschützt aufbewahrt. Danach können die nun blau gefärbten Enzymmuster ausgewertet werden.

g) Dokumentation

Die gefärbte Gelplatte muß 10 min. im Kühlschrank liegen, wodurch verhindert wird, daß sich das Färbe- vom Elektrophoresegel trennt.

Folgendes Fixiermittel stoppt nun die Reaktionskette:

70 ml Aethanol (96 %), 4,75 ml Eisessig (konz.) ad 95 ml aqua dest. Die Agarplatte bleibt 1/2 Std. im Fixierbad, wird dann vorsichtig von der Glasunterlage gelöst, auf ein dünnes aber festes Blatt Papier aufgezogen und mit Fließpapier abgedeckt. Nach ca. 24 stündiger Aufbewahrung an einem lichtgeschützten, trockenen Ort ist die entwässerte Agarplatte zu einer hauchdünnen, wenig lichtempfindlichen Folie geworden, die beliebig lange aufbewahrt werden kann (bisher 1 1/2 Jahre).

17 JULI 1970

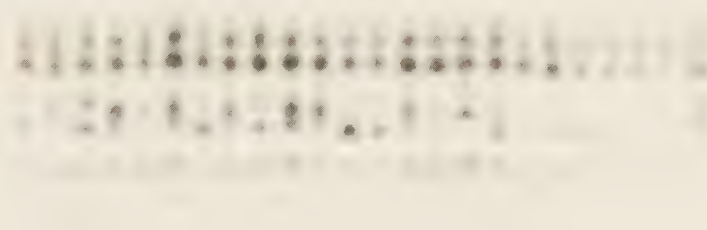


Abb. 3: Fotografie einer zur Folie getrockneten Agarplatte.
Versuch vom 17. Juli 1970 mit 24 Proben.
Zur Typenbestimmung vergleiche Abb. 2

3. Technik der Stärkegel-Elektrophorese zur Darstellung der SEP-Typen

Mit Hilfe der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES (71, 72) trennten HOPKINSON et al. 1963 zum ersten Male die saure Erythrozytenphosphatase in ihre Isoenzyme auf (29). Wir lehnten uns bei unseren Untersuchungen an die bei RADAM und STRAUCH beschriebene Modifikation dieser Methode an (62).

a) Erforderliche Geräte

Wir verwendeten Elektrophoresekammern (Elphor) der Firma Bender und Hobein, deren Geltröge durch eine 2 mm starke Glasplatte von 10 mm auf 8 mm Tiefe reduziert wurden. Die notwendige Spannung kann man von jedem Gerät, das zwischen 100 bis 500 V und 0 - 100 mA regelbar ist, abgreifen. Konstante Spannung ist vorteilhaft. Entsprechend zugeschnittene Leinenlappchen dienen als Pufferbrücken und werden, wie auch der Gelblock, mit Plastikfolien abgedeckt. Als Probeträger tränkten wir Fließpapierplättchen der Größe 7 x 7 mm (Schleicher und Schüll Nr. 5703) mit Hämolytat.

b) Die Pufferlösungen

1. Der Anodenpuffer dient gleichzeitig als Stammlösung für die anderen Puffer. Um 5000 ml anzusetzen löst man:

221,0 g tri-Natriumcitrat-2-hydrat
169,0 g Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat
9,3 g Titriplex III oder Idranal III

in 4,8 l aqua dest. und stellt mit 1 n NaOH auf pH = 6,0 ein. Was an 5 l fehlt wird mit aqua dest. aufgefüllt. Bis zur Verwendung sollte der Puffer kühl aufbewahrt werden.

2. Der Kathodenpuffer setzt sich aus einem Teil Anodenpuffer und 3 Teilen aqua dest.,
3. der Gelpuffer aus einem Teil und 99 aqua dest. und
4. der Substratpuffer aus einem Teil Anodenpuffer und 7 Teilen aqua dest. zusammen.

c) Die Gelbereitung

Zum Herstellen eines Gelblockes werden 24 g Stärke (Starch-hydrolyzed, Commaught Medical Research Laboratories, Toronto, Canada, oder Stärke zur Stärkegel-Elektrophorese nach Smithies, Serva, Heidelberg) in 200 ml Gelpuffer aufgeschwemmt, in einem Rundkolben mit langem Hals zum Sieden gebracht und mit einer Wasserstrahlpumpe entgast, um ein möglichst blasenfreies Gel zu gewinnen. Die heiße Flüssigkeit wird in die exakt waagrecht aufgestellten Geltröge gegossen. Nach 1 - 2 Std. kann der Block beimpft werden.

d) Ausführung der Elektrophorese

Auf der Kathodenseite stanzen wir mit einem Messer Schlitzte von ca. 0,8 mm Breite etwa 40 mm vom Ende des Gelblockes, so daß 8 Proben gleichzeitig untersucht werden konnten. In diese Schlitzte brachten wir mit Hämolytat getränkte Fließpapierplättchen ein, deren oberer Rand ca. 1 mm unter der Geloberfläche liegen sollte. Der Geltrog wird in die Kammer, die mit den verschiedenen Brückenpuffern gefüllt ist, eingesetzt; die angefeuchteten Stoffbrücken stellen die Verbindung Puffer-Gel her. Gel und Leinenlappchen werden mit Polyäthylenfolien abgedeckt. Dann wird die Stromquelle für 16 - 17 Std. angeschlossen; bei einer Spannung von 200 V fließen etwa 28 - 30 mA.

Die Hb-Fraktion wandert zur Kathode, das Enzym zur Anode. Bei Verwendung von 2 Elektrophoresekammern zur gleichzeitigen Untersuchung von 16 Proben können diese in Reihe geschaltet von einem Netzgerät gemeinsam versorgt werden. Hierbei ist aber Voraussetzung, daß die elektrischen Widerstände beider Kammern übereinstimmen, um bei der doppelten Spannung (400 V) keine Stromdifferenzen zu erzeugen. Modifikationen an den Elektroden zur Verminderung des Spannungsabfalles (GUSSMANN (22)) waren bei uns nicht erforderlich.

e) Färbung der Fraktionen auf Grund ihrer Reaktion mit dem Substrat

Nach Ablauf der Elektrophorese wird ein in den Färbetrog passendes Stück (90 x 115 mm) aus dem Block ausgeschnitten, wobei etwa 10 mm von den Startschlitzen kathodenwärts miterfaßt werden sollen. Das Gel wird sodann mit 20 ml Substratlösung überschichtet, die aus 64 mg Phenolphthalein-diphosphat-mono-Pyridinsalz (Boehringer) in 20 ml Substratpuffer gelöst, besteht. Nach 3 1/2-stündiger Reaktionszeit im Brutschrank bei 37° C gießt man die Flüssigkeit sorgfältig ab und tropft ca. 3 ml 25 %ige Ammoniaklösung auf das Gel. Nach 15 Min. stellen sich die Isoenzymfraktionen als rote Flecken dar, die jedoch nur 2 Std. scharf umrandet bleiben. Später wird das Ablesen unmöglich.

III. Ergebnisse

A) Methoden der Isoenzymdarstellung

Wir führten die PGM_1 -Typenbestimmung in erster Linie nach der oben beschriebenen Methode der Agargel-Elektrophorese durch. Anfänglich ließen wir zur Kontrolle dieselben Proben im Stärkegel, wie es von SPENCER et al. 1964 (74) zuerst beschrieben wurde, mitlaufen. Die Typendiagnose, auch die der SEP, ist von mindestens zwei Personen unabhängig voneinander gestellt worden; dabei sind keine Differenzen aufgetreten zwischen den Mustern beider Systeme im Stärke- und Agargel.

In beiden Systemen - PGM_1 und SEP - sind weder unbestimmbare Typen, Enzymdefekte, noch Typ-Transformationen oder seltene Typen vorgekommen.

Bei der Färbung der SEP beobachteten wir bei den AB-, BB- und BC-Phänotypen eine zusätzliche Fraktion, die sich anodwärts der C-Fraktion anfärbte. Sie war in 32 % aller BB-, in 4 % der AB- und 11 % der BC-Typen vertreten (s. auch 6, 63).

B) Untersuchungen am Blut Anaemiekranker

Die SEP- und PGM_1 -Typen der 53 uns zur Verfügung stehenden Proben wurden bestimmt und Aktivitätsvergleiche in Verdünnungsreihen auch mit gesunden, schon vorher bestimmten Proben, angestellt.

Die Verteilung der Kranken auf die einzelnen Isoenzymmuster ergibt folgendes Bild:

	SEP	AA	AB	AC	BB	BC	C	Σ
Kranke	abs.	5	24	-	20	4	-	53
	in %	9,3	45,4	-	37,8	7,5	-	100
Gesunde (s.u.)	in %	14,3	40,5	3,7	34,2	7,2	0,1	100

Genfrequenzen: $Ph^A = 0,32$ $Ph^B = 0,64$ $Ph^C = 0,04$

	PGM ₁	1 - 1	2 - 1	2 - 2	Σ
Kranke	abs.	42	7	4	53
Kranke	in %	79,3	13,2	7,5	100
Gesunde (s.u.)	in %	61,5	34,5	4,0	100

Genfrequenzen: $PGM_1^1 = 0,859$, $PGM_1^2 = 0,141$

Bei den Citrat-Blutproben Gesunder ist die Verdünnung, die als erste keine Typen-Diagnose mehr erlaubt, mit der SEP 4-fach, der PGM 16-fach. Davon wichen auch die pathologischen Blutproben nicht ab. Es fielen jedoch gegenüber den normalen Kontrollen besonders stark konzentrierte Fraktionen in der PGM auf: 82 % aller a Banden im PGM₁ 1 - 1 Typ, die sich bis in die letzte Verdünnung (32-fach) verfolgen ließen (s. Abb. 4).

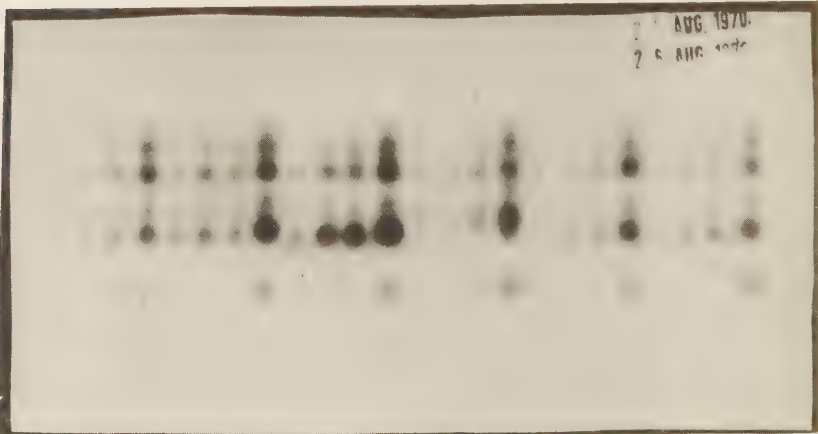


Abb. 4: Versuchsserie vom 26. Aug. 1970 mit 6 Blutproben von Anaemie-Kranken in Verdünnungsreihen:
Von rechts nach links 1 : 1, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32.

C) Haltbarkeitsuntersuchungen

Während Citrat-konservierte Blutproben selbst einen Tag nach Entnahme nur noch bis in die 8-fache Verdünnung eine klare PGM₁- und in die 4-fache eine deutliche SEP-Typenbestimmung erlauben, bleibt im ACD-stabilisierten Blut die Aktivität der Fraktionen eine beträchtliche Zeitspanne bis in 32-fache (PGM) und 8-fache (SEP) Verdünnung zur Diagnose hinreichend stark.

1. ACD-stabilisiertes Blut

Der Aktivitätsrückgang bei der SEP vollzieht sich allmählich, während in der PGM ein plötzlicher Abfall von 32- auf 16-fache Verdünnung zwischen dem 14. und 20. Tag auftritt. Dieser Abstand ließ sich nicht durch Untersuchungen von Proben, die altersmäßig dazwischen lagen, einengen.

Alter/Tage	7	10	14	20	23	30	40
PGM-Verdünnung	32	32	32	16	16	8	8
SEP-Verdünnung	8	8	4	4	4	4	2

Parallel durchgeführte Versuche zur Erythrozytensenkungsbereitschaft in Gummi arabicum/Na-citrat (s. u.) und der K⁺-Konzentration im Serum vor und nach Erwärmung auf 37° C lieferten ein vergleichbares Phänomen, daß nämlich gelagerte Erythrozyten, die keine Senkungsfähigkeit mehr besaßen, diese nach Wärmebehandlung wiedererlangten, sofern ihr Alter nicht höher als 21 Tage war. Messungen von K⁺-Konzentrationen zeigten, daß die Blutzellen vor diesem Schwellenalter bei Körpertemperatur auch die Fähigkeit, K⁺-Ionen aufzunehmen, wiedererlangen. PGM- und SEP-Aktivitäten verändern sich nach Wärmeeinwirkung gegenüber den Kaltproben nicht (s. auch 37 und 38c).

2. "Bio-Test"-Zellen

Die Konservierung dieser Erythrozyten erhält die PGM- und SEP-Aktivität deutlich länger als der ACD-Stabilisator oder gar das Eigenserum mit Citratzusatz. Dabei beobachteten wir auch Unterschiede in Test-Erythrozyten verschiedener Herstellerfirmen.

Alter/Tage	30	60	80	150
PGM/Verdünnung	16	8	4	kaum Aktivität
SEP-Verdünnung	4	2	2	kaum Aktivität

In beiden Fällen (ACD-stabilisierte und "Bio-Test"-Zellen) wurde aber ein rapider Aktivitätsverlust notiert, wenn das Hämolysat nach Lagerung im Kühlschrank erneut analysiert wurde. Hierbei blieb die PGM-Aktivität etwa eine Woche, die SEP 2 Tage zur Diagnose hinreichend stark nachweisbar.

3. Enzymtests zur Veränderung der Membranoberfläche

Alle vier Gruppen, die papainisierte, die mit Neuraminidase behandelte, die in NaCl erwärmte und die routinemäßig untersuchte, zeigten identische Bilder. Der Papainisierungserfolg war im inkompletten Agglutinationstest, der Neuraminidaseeffekt durch Panagglutination der Blutzellen nachgewiesen worden.

D) Mutter-Kind-Typenvergleiche

Die Zusammengehörigkeit der hier aufgeführten Mutter-Kind Paare ist durch Prüfung in folgenden Merkmalssystemen gesichert:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| 1. ABO | 8. Haptoglobine |
| 2. MNSS | 9. Gc-Faktoren |
| 3. Rh (C, c, D, E, C ^W) | 10. PGM ₁ |
| 4. Knell (K, k) | 11. SEP |
| 5. Duffy (Fy a, Fy b) | 12. Adenylatkinase |
| 6. Gm (1, 2) | 13. Adenosindeaminase |
| 7. Inv (1) | |

Die 79 von uns in Bezug auf ihre PGM₁- und SEP-Isoenzymtypen untersuchten Mutter-Kind Paare zeigten folgende Verteilung:

PGM	Mütter n ↓	1-1	2-1	2-2	← Kinder
1-1	48	39	9	∅	48
2-1	27	11	13	3	27
2-2	4	∅	4	-	4
Σ	79	50	26	3	Kinder ← n

SEP	Mütter n ↓	AA	AB	AC	BB	BC	CC	← Kinder
AA	11	2	9	-	-	-	-	11
AB	35	5	16	1	12	1	-	35
AC	4	1	-	1	-	2	-	4
BB	23	-	6	-	15	2	-	23
BC	6	-	2	-	2	2	-	6
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
Σ	79	8	33	2	29	7	-	Kinder ← n

Im PGM₁-System kommen 52, in der SEP 34 "kritische" Paare vor, d. h. die Mutter ist homozygot.

E) Populationsgenetik

Insgesamt kamen ca. 1000 Blutproben zur Typenbestimmung. Daraus werteten wir eine Stichprobe von 753 Proben aus, deren Spender in Osthessen - Fulda und Umgebung - ansässig und unseres Wissens nicht miteinander verwandt waren.

1. Aufstellung nach Frauen und Männern gesondert

		PGM ₁			SEP						
		1-1	2-1	2-2	AA	AB	AC	BB	BC	CC	Σ
Männer		253	103	14	57	135	17	136	25	-	370
	in %	68,4	27,9	3,7	15,4	36,5	4,6	36,8	6,7	-	100
		210	157	16	51	170	11	121	29	1	383
Frauen											
	in %	54,9	41,0	4,1	13,3	44,4	2,9	31,6	7,6	0,2	100

Genfrequenzen: ♂ $PGM_1^1 = 0,82$ $Ph^A = 0,36$ $Ph^C = 0,05$
 $PGM_1^2 = 0,18$ $Ph^B = 0,59$

♀ $PGM_1^1 = 0,75$ $Ph^A = 0,37$ $Ph^C = 0,05$
 $PGM_1^2 = 0,25$ $Ph^B = 0,58$

2. Gesamtaufstellung

		PGM ₁			SEP					
		1-1	2-1	2-2	AA	AB	AC	BB	BC	CC
beobachtet	abs.	463	260	30	108	305	28	257	54	1
	in %	61,5	34,5	4,0	14,3	40,5	3,7	34,2	7,2	0,1
erwartet	abs.	462,3	253,0	34,6	97,9	320,0	27,1	262,0	44,4	1,5
	in %	61,6	33,6	4,6	13,0	42,5	3,6	34,8	5,9	0,2

Größe der Stichprobe: 753

Bei der Schätzung der Genfrequenzen aus dieser Stichprobe nach der Zählmethode ergeben sich folgende Werte:

$$PGM_1^1 = 0,784 \quad PGM_1^2 = 0,214$$

$$Ph^A = 0,36 \quad Ph^B = 0,59 \quad Ph^C = 0,05$$

Unter der Voraussetzung der Panmixie und des genetischen Gleichgewichtes berechnen sich die Erwartungswerte nach den Polynomialfunktionen - für die PGM: $p^2 + 2pq + q^2$,

- für die SEP: $p^2 + 2pq + q^2 + 2qr + 2pr + r^2$.

Vergleiche der beobachteten mit den erwarteten Werten nach der χ^2 -Funktion liefern folgende Ergebnisse:

$$PGM: \chi^2 = 0,91 \text{ (df 1); } 0,3 < P < 0,5$$

$$SEP: \chi^2 = 4,06 \text{ (df 4); } 0,3 < P < 0,5$$

IV. Besprechung

A) Besondere Eigenschaften der Darstellung des PGM₁-Isoenzym-polymorphismus mittels der Elektrophorese in Agargel

Wir haben etwa 200 Blutproben in der Agar- und Stärkegel-Elektrophorese gleichzeitig untersucht und konnten keine abweichende Isoenzymmuster beobachten. Mit Azetatmembran-folie haben wir nicht gearbeitet. Wenn auch die Wanderungs-strecke der Proteine im Agargel insgesamt etwas kürzer ist - 6 cm gegenüber 8 cm - leidet die Ablesegenauigkeit da-runter nicht, da die "spots" kleiner und schärfer begrenzt sind. Seltene Typen sind weder im Agar- noch Stärkegel vor-gekommen, was bei der geringen Genfrequenz in Mitteleuropa nicht verwunderlich ist. Im Ganzen gesehen können wir die Erfahrungen anderer Autoren bestätigen, die auf Vorzüge der kurzen Untersuchungsdauer und des geringen Material-aufwandes hinweisen (36, 51).

Daran schließt sich noch die von uns erprobte, oben be-schriebene Methode der Dokumentation (Agargelhaut) an, die die fotografische Reproduktion überflüssig macht. Jedoch muß die relativ große Störanfälligkeit wie ungleich-mäßige Wanderungsgeschwindigkeit der Proben, unzureichende Trennung des Isoenzymgemisches erwähnt werden, der man aber durch genaues Arbeiten begegnen kann.

B) Beurteilung der Beobachtungen bei der Untersuchung des Blutes Anaemiekranker

VALENTINE et al. (76) beschrieben 1961 einen erheblichen Anstieg der SEP im Einzelerythrozyten von Patienten mit Megaloblastenanaemie. Wir konnten diese Beobachtung jedoch nicht in Bezug auf ein gegebenes Blutvolumen ausweiten, da eine Aktivitätszunahme in Größenordnungen nach VALENTINE et al. auch in unseren Verdünnungsreihen hätte auffallen müssen. Enzymmengenwuchs in der Einzelzelle ist durchaus wahrscheinlich, da diese unter den pathologischen Gegeben-heiten auch wesentlich größer ist; das läßt sich aber nicht als Konzentrationsanstieg im Gesamtblut verstehen.

Sämtliche Proben konnten einem distinkten SEP- und PGM₁-Typ zugeordnet werden. Abweichende Genfrequenzen, was auf Zusammenhänge zwischen Krankheit und Typ hinweisen könnte, sind nicht überzeugend. Da wir keine Familienuntersuchungen durchführten und auch vor oder nach der Krankheit keine Kontrolle machen konnten, sind wir nicht in der Lage, die Möglichkeit von Transformationen zu diskutieren.

Bei der PGM liegen meines Wissens keine Untersuchungen pathologischer Blutproben vor. Da wir die Gesamtaktivität des Enzyms nicht exakt gemessen haben, kann auch keine streng quantitative Aussage zu Aktivitätsänderungen in den untersuchten Erythrozyten gemacht werden. Es liegt aber nach unseren Ergebnissen doch nahe anzunehmen, daß die aktive Enzymmenge im Blute von Patienten mit Megaloblastenanaemie vermehrt ist. Besonders die regelmäßig sehr starke a-Fraktion im sonst schwachen PGM₁ 1-1-Isoenzymbild - dieser Typ ist in unserem Untersuchungsmaterial außerdem noch stark überrepräsentiert (79,3 % / 61,5 %) - und die übrigen normalen Fraktionen machen darauf aufmerksam.

Ob diese Phänomene, die starke a-Fraktion und der häufige PGM₁ 1-1-Typ, jedoch charakteristisch für die betreffende Erkrankung ist, kann erst durch Untersuchungen größeren Umfangs ermittelt werden.

C) Haltbarkeitsunterschiede der Enzymtypen unter den gegebenen Bedingungen

Die Stabilität der Erythrozyten und ihrer Enzyme muß nach den erzielten Ergebnissen mindestens zum Teil Funktion ihres Milieus sein. So zerfallen die SEP und PGM-Isoenzyme, wenn sie vom Zellverband z. B. durch Hämolyse getrennt werden, sehr rasch. Erythrozyten im eigenen Serum bei Citratzusatz ohne weitere Nährstoffe vermögen die Aktivität ihrer Enzyme schon wesentlich länger zu erhalten, besonders wenn sie bei niedriger Temperatur gelagert werden.

Unsere Untersuchungsergebnisse bei Zellen, deren Stoffwechsel von speziellen Nährmedien noch für eine Weile gewährleistet war, unterstützen die Vorstellung, daß die beiden Enzyme - die SEP in größerem Maße als die PGM - durch die intakte Zelle in nativer Form gehalten werden. Bricht das Erythrozytengefüge zusammen, was unter anderem auch durch verminderte Senkungsbereitschaft und K^+ -Aufnahmefähigkeit angezeigt wird, verlieren auch seine Enzyme eine essentielle Grundlage ihrer Funktionstüchtigkeit.

Die Versuche mit Andauung der Erythrozytenoberfläche durch proteolytische Fermente verdeutlichen, daß weder SEP- noch PGM-Wirksamkeit an bestimmte Rezeptorsysteme der Zelloberfläche gebunden sind, daß Verlust serologischer Eigenschaften nicht mit Veränderungen der Enzymaktivität oder des Isoenzymusters einhergeht.

D) Beitrag von 79 Mutter- Kind Paaren zu Resultaten anderer Autoren

In unserem Untersuchungsmaterial waren insgesamt 52 homozygote Mütter im PGM_1 - und 34 im SEP-System vertreten, deren Kinder der geltenden Theorie des Erbganges dieser Merkmale zu Folge keine entgegengesetzte Reinerbigkeit aufweisen durften. In umfangreichen Erhebungen zu diesem Problem ist ein solcher Fall noch nicht vorgekommen, und auch unser Ergebnis paßt sich in das angewandte Genmodell ein.

Hier eine Übersicht über die bisher gewonnenen Resultate:

1. PGM₁-Typen

		Mütter ↓ Kinder	1-1	2-1	2-2
Berlin (58)	1-1	105	85	20	-
Berlin (2)		117	82	35	-
Mainz (2)		18	16	2	-
Hamburg (17)		390	308	82	-
Fulda *		48	39	9	-
		678	530	148	-
Berlin (58)	2-1	62	26	32	4
Berlin (2) (Fiedler)		79	25	48	6
Mainz (2)		9	4	4	1
Hamburg (17)		208	86	102	20
Fulda *		27	11	13	3
		385	152	199	34
Berlin (58)	2-2	6	-	5	1
Berlin (2) (Fiedler)		18	-	12	6
Mainz (2)		2	-	1	1
Hamburg (17)		35	-	24	11
Fulda *		4	-	4	-
		65	-	46	19
Summa summarum		1128	682	393	53

* Diese Untersuchung

Gesamtzahlen der Mutter-Kind-Paare: Berlin 173 (58),
Berlin 214 (2), Mainz 29 (2), Hamburg 629 (17), Fulda 79

2. SEP-Typen

		Mütter ↓ Kinder	AA	AB	AC	BB	BC	CC
Berlin (35, 59)	110	AA	35	72	3	-	-	-
Heidelberg (18)	22		9	11	2	-	-	-
Fulda *	11		2	9	-	-	-	-
	143		46	92	5	-	-	-
Berlin (35, 59)	337	AB	67	164	9	88	9	-
Heidelberg (18)	48		16	20	-	12	1	-
Fulda *	35		5	16	1	12	-	-
	420		88	200	10	112	10	-
Berlin (35, 59)	48	AC	11	15	8	-	12	2
Heidelberg (18)	4		-	1	1	-	2	-
Fulda *	4		1	-	1	-	2	-
	56		12	16	10	-	16	2
Berlin (35, 59)	301	BB	-	95	30	176	-	-
Heidelberg (18)	60		-	19	-	41	-	-
Fulda *	23		-	6	-	19	2	-
	384		-	120	30	232	2	-
Berlin (35, 59)	73	BC	-	8	7	18	39	1
Heidelberg (18)	6		-	-	-	4	2	-
Fulda *	6		-	2	-	2	2	-
	85		-	10	7	24	43	1
Berlin (35, 59)	2	CC	-	-	1	-	1	-
Heidelberg (18)	-		-	-	-	-	-	-
Fulda *	-		-	-	-	-	-	-
	2		-	-	1	-	1	-
Summa summarum	1090							

* Diese Untersuchung

Gesamtzahl der Mutter-Kind-Paare: in Berlin 871,
in Heidelberg 140, in Fulda 79

An den Erbgängen von Phosphoglukomutase- und saure Erythrozytenphosphatase-Isoenzymen, wie sie oben beschrieben sind, besteht angesichts der Ergebnisse deutscher und internationaler Untersuchungen kein Zweifel mehr.

E) Typenverteilung der SEP- und PGM₁-Isoenzyme im
mit Untersuchungen in anderen Teilen Deutschlands
und Europas

Im folgenden gebe ich eine Zusammenfassung der Genfrequenzen der PGM- und SEP-Typen soweit sie aus der Literatur zu entnehmen sind.

	n	PGM ₁ ¹	PGM ₁ ²	Σ
Deutschland				
Mainz (2)	392	0,8265	0,1735	1,000
Frankfurt/M. (66)	422	0,796	0,204	1,000
Frankfurt/M. (36)	515	0,791	0,209	1,000
Berlin (14)	860	0,788	0,212	1,000
Berlin (15)	500	0,787	0,213	1,000
Fulda *	753	0,784	0,216	1,000
Hamburg (5)	722	0,78	0,22	1,000
Rotenburg (36)	210	0,776	0,224	1,000
Freiburg (2)	787	0,772	0,228	1,000
Berlin (36)	859	0,771	0,229	1,000
Freiburg (36)	1637	0,753	0,247	1,000
Freiburg (5)	229	0,751	0,249	1,000
Berlin (2)	302	0,7430	0,2570	1,000
Norwegen				
Lappen (52)	84	0,513	0,487	1,000
Dänemark (40)				
	475	0,808	0,192	1,000
Großbritannien				
London (33)	2115	0,764	0,235	0,999
London (74)	338	0,74	0,26	1,000
Irland (34)	106	0,864	0,136	1,000
Österreich				
Wien (28)	157	0,7962	0,2038	1,000
Schweiz				
Bern (2)	300	0,8185	0,1815	1,000
Griechenland (5)				
	88	0,69	0,31	1,000

* Diese Untersuchung

Die Genfrequenzen der PGM-Typen lassen keine offensichtlichen geographischen oder völkerkundlichen Ordnungstendenzen erkennen, aber außereuropäische Erhebungen weichen oft beträchtlich ab (53).

Die Veröffentlichungen zu den SEP-Isoenzymmustern der europäischen Bevölkerung sind weniger umfassend als die zur PGM.

Für außereuropäische Ergebnisse siehe auch 3, 79.

	n	Ph ^A	Ph ^B	Ph ^C
Deutschland				
Berlin (61)	1188	0,362	0,577	0,061
Fulda *	753	0,36	0,59	0,05
Marburg/L. (67)	334	0,3572	0,6008	0,0423
Hamburg (7)	558	0,351	0,586	0,062
Heidelberg (18)	401	0,328	0,630	0,042
Freiburg (81, 82)	300	0,310	0,643	0,047
Dresden (26)	67	0,298	0,642	0,060
Freiburg (21)	171	0,27	0,72	0,01
Dänemark (40)				
	470	0,3415	0,6021	0,0564
Großbritannien				
London (31)	275	0,366	0,567	0,067
London (30)	367	0,36	0,60	0,04
London (29)	138	0,349	0,604	0,067
Frankreich (77)				
	134	0,394	0,547	0,059
Österreich				
Wien (28)	406	0,35	0,58	0,06
Italien				
Rom (48)	417	0,216	0,658	0,08
Sardinien (48)	365	0,268	0,641	0,09

* Vorliegende Untersuchung

Bei einigen der aufgeführten Stichproben erscheint mir eine kritische Betrachtung angezeigt, da die Zahl der untersuchten Personen recht gering ist.

V. Zusammenfassung

1. Die Methode der Agargel-Elektrophorese zur Auftrennung der Phosphoglukomutase (PGM)-Isoenzyme, die MONN 1968 einführt, sich aber bisher nicht allgemein durchsetzen konnte, wird eingehend beschrieben und mit den Resultaten der bisher üblichen Stärkegel-Elektrophorese an 200 Proben verglichen. Das Verfahren nach MONN erwies sich als ökonomischer in materieller und zeitlicher Hinsicht. Es ist nicht mit gravierenden Nachteilen behaftet. Die Arbeitsvorschrift für diese Methode wird eingehend beschrieben, wie sie von uns erarbeitet wurde. Die Bestimmung der sauren Erythrozytenphosphatase (SEP)-Typen führten wir auf den Grundlagen der Beschreibung von HOPKINSON et al. aus.
2. In Verdünnungsreihen des hämolysierten Blutes von 53 Patienten mit Megaloblastenanaemie treten im SEP-System keine Unterschiede zu Kontrollproben Gesunder auf, während unsere Ergebnisse bei den PGM₁-Isoenzymen Häufung des Typs 1-1, Aktivitätsverschiebungen oder Steigerungen erkennen lassen. Diese Beobachtungen bedürfen jedoch noch der Bestätigung durch umfangreichere Untersuchungen.
3. Resultate von Serienuntersuchungen an unterschiedlich alten und in verschiedenen Konservierungsmedien (ACD und "Biotest-Medium") gelagerten Erythrozyten zeigen, daß die Aktivitäten beider Enzymsysteme parallel mit der Funktionstüchtigkeit, der Unversehrtheit ihrer Trägerzellen einhergehen. Die Lagerung verursacht keine Typentransformationen. Einwirkung proteolytischer und anderer Enzyme wie Papain und Neuraminidase auf die Zellmembran beeinflussen SEP- und PGM-Isoenzytmuster und Aktivitäten nicht.

4. 79 auf ihre PGM₁- und SEP-Typen untersuchten Mutter-Kind Paare stützen durch die gewonnenen Resultate das geltende Genmodell und stehen so im Einklang mit Erhebungen anderer Autoren.

Die Gesamtzahl der bestimmten Paare beläuft sich im PGM-System auf 1128, bei der SEP auf 1090.

5. Die von Autoren aus verschiedenen Teilen Deutschlands und anderen europäischen Ländern zusammengestellten Genfrequenzen werden unseren Ergebnissen für Osthessen gegenübergestellt. Die Typenverteilung läßt keine weiterreichenden Schlüsse zu.

VI. Literaturverzeichnis

1. Abul-Fadl M.A.M.
KING, E.J.
Properties of the Phosphatase
of Erythrocytes and of the
Human Prostate Gland
Biochem. J. 45: 51-60 (1949)
2. ARNDT-HANSER, A.
Frequenz der Phosphoglukomutase
in: Referate gehalten auf der
gemeinsamen Tagung der Gesell-
schaft für forensische Blut-
gruppenkunde e.V. und der
Arbeitsgemeinschaft gerichtl.
Blutgruppensachverständiger
24. - 26. April 1969 in Travemünde
3. BAJATZADEH, M.
NEUMANN, S.
WALTER, H.
Pseudocholinesterase and Human
Red Cell Acid Phosphatase in
Koreans
Humangenetik 7: 91-92 (1969)
4. BAJATZADEH, M.
WALTER, H.
PALLSSON, J.
Phosphoglucomutase (EC 2.7.51)
and adenylate kinase (CEC 2.7.43)
typings in Koreans and Irish
Humangenetik 7: 353-355 (1969)
5. BRINKMANN, B.
Methodische Erfahrungen mit den
Phosphoglucomutasetypen im Ab-
stammungsgutachten in Bericht
über die 6. Tagung der Arbeits-
gemeinschaft der Blutgruppensach-
verständigen
Mainz 1968

6. BRINKMANN, B. Erythrozytäre Enzym polymorphismen
in der forensischen Serologie
Z. Rechtsmedizin 69, 83-117 (1971)
7. BRINKMANN, B. Saure Erythrozytenphosphatase
REICH, K. Ärztl. Labor 13: 346-351 (1967)
8. BOEHRINGER, Mannheim Alkalische Phosphatase
Saure Phosphatase
Biochemica Information (1969)
9. BOEHRINGER, Mannheim Phosphoglucomutase
Biochemica Information (1967)
10. CLARKE, C. A. Blood groups and disease
Progr. med. genet. 1: 18-119
1961
11. CORI, G. T. The Formation of Glucose-1-
COLOWICK, S. P. Phosphoric Acid in Extracts of
CORI, C. F. Mammalian Tissues and of Yeast
J. Biol. Chem. 123: 375 (1938)
12. FIALKOW, P.J. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase:
LISKER, R. Hemizygous Manifestation
DETTER, J. Patient with Leukemia
GIBLETT, E.R. Science 163: 194-195 (1969)
ZAVALA C.
13. Fichtner, K. Die blutgruppenspezifischen
CLEVE, H. Elektrophoresetypen der alkalischen
KRÜPE, M. Serumphosphatase bei Gesunden und
WENDT, J.G. bei Patienten mit Gastrointestinalen
Erkrankungen
Humangenetik 4: 244-261 (1967)

21. GOEDDE, W.H.
RITTER, H.
CALLSEN, U.
FLOCK, H. Untersuchungen zum Polymorphismus
der sauren Erythrozytenphosphatase
Humangenetik 3: 113-120 (1966)
22. GUSSMANN, St. Apparatur zur Darstellung der
Enzym polymorphismen
Ärztl. Labor 15: 333-335 (1969)
23. GUSSMANN, S Beitrag zur Differentialdiagnose
des Typs C der sauren Phosphatase
der Erythrozyten des Menschen
(EC. 3.1.3.2.)
Z. Rechtsmedizin 67, 227-229 (1970)
24. HASHIMOTO
SASAKI Hormonal Control of Phosphogluco-
mutase Activity
YOSHIKAWA Biochem. a. Biophys. Research Comm.
27: 268-271 (1967)
25. HEIDEL, G. Die spurenkundliche Bedeutung der
Typen der sauren Erythrozyten-
phosphatase
Dtsch. z. gerichtl. Med. 63: 37-43
(1968)
26. HEIDEL, G.
REIMANN, W. Bestimmung der sauren Phosphatase
der Erythrozyten im Leichenblut
Dtsch. z. gerichtl. Med. 62:
207-211 (1968)
27. HENNEBERG, G.
KÖHLER, H. Praktikum der Virusdiagnostik
Stuttgart 1961
28. HERBICH, J.
KAHLICH, D.M. Verteilung der sauren Erythrozyten-
phosphatase in der Bevölkerung von
Wien und Umgebung
Wiener klin. Wochenschrift 80:
452-460 (1968)

29. HOPKINSON, D.A. Red Cell Acid Phosphatase
SPENCER, N. Variants : A
HARRIS, H. New Human Polymorphism
Nature 199: 969-971 (1963)
30. HOPKINSON, D.A. Genetical Studies on Human Red
SPENCER, N. Cell Acid Phosphatase
HARRIS, H. Human Genetics 16: 141-154 (1964)
31. HOPKINSON, D.A. Quantitative Differences and Gen
SPENCER, N. Dosage in the Human Red Cell Acid
HARRIS, H. Phosphatase Polymorphism
Nature 201: 299-300 (1964)
32. HOPKINSON, D.A. Evidence for a Second "Structural"
HARRIS, H. Locus determining Human Phospho-
glucomutase
Nature 208: 410-412 (1965)
33. HOPKINSON, D.A. Rare Phosphoglucomutase Phenotypes
HARRIS, H. Ann. Hum. genet. (1966) 30: 167-181
34. HOPKINSON, D.A. A third phosphoclucomutase locus
HARRIS, H. in man.
Ann. Hum. genet. 31: 355 (1968)
35. KLOSE Zur Technik der elektrophoreti-
schen Darstellung der sauren
Erythrozytenphosphatase am Insti-
tut für gerichtl. Medizin der
Humboldt-Universität Berlin
in Bericht über die 5. Tagung der
Arbeitsgemeinschaft der Blutgrup-
pensachverständigen
Würzburg 1967
36. KNEIPHOF, H. Bestimmung der Phosphoglucomutase
NAGEL, V. Ärztl. Labor 16: 354-360 (1970)

37. KRÜPE, M. Beobachtungen über die Erythrozytensenkungsbereitschaft im konservierten Menschenblut
Zeitschrift für d. gesamte exp. Medizin 112: 649-670 (1943)
- 38 a. KRÜPE, M. Die Haptoglobin-, Gc-Globulin- und Transferrin-Serumgruppen des Menschen, ihre Differenzierung mit der vertikalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SCHMITT, J. Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Allergie und kl. Immunologie 137: 307-313 (1969)
- 38 b. KRÜPE, M. Immunphatologie und Blutgruppenuntersuchungstechnik bei Morbus haemolyticus neonatorum
Hess. Ärzteblatt 25 Jahrgang, Heft 5: 310-314 (1964)
- 38 c. LAMBERS, K. Über die Beziehung zwischen Kaliumionenpermeabilität und Senkungsbereitschaft der Erythrozyten im konservierten Blut
KRÜPE, M. Dissertation, Marburg 1950
39. LAI, L. Acid Phosphatase of Human Red Cells:
NEVO, Sahra Predicted Phenotype Conforms to a genetic Hypothesis
STEINBERG, A.G. Science 45: 1187-1188 (1964)
40. LAMM, L.U. Red Cell Phosphoglucomutase and Acid Phosphatase Types among Danish Blood Donors
Acta genet. Basel 18: 386-393 (1968)

41. LAMM, L.U. Detection of the third phospho-
glucomutase locus (PGM_3) in human
leucocytes
Hereditas 61: 282-285 (1969)
42. FU, Linda Evidence against the reported
AZEVEDO, Eliane linkage of Phosphoglucomutase
MORTON, N.E. (PGM_1) and Phenylthiocarbamide-
Tasting (PTC)
Acta genet. Basel 18: 416-419
1968
43. LUAH ENG, Lie-Ingo Phosphoglucomutase Polymorphism:
an Unusual Type in Negroes
Nature 210: 1183-1184 (1966)
44. MARTLAND, M. The Phosphoric-esterase of Blood
HANSMAN, F.S. Biochemical Journal 18: 1162
ROBINSON, R. (1924)
45. Mc ALPINE, P.G. The relative Activities
HOPKINSON, D.A. attributable of the three phos-
HARRIS, M. phoglucomutase loci PGM_1 , PGM_2 ,
 PGM_3 in Human tissues
Ann. Hum. genet. 34: 169-173 (1970)
46. Mc ALPINE, P.J. Thermostability studies on the
HOPKINSON, D.A. isoenzymes of human Phosphogluco-
HARRIS, H. mutase
Ann. Hum. genet. London 34: 61-71
(1970)
47. MISCHOL, H.R. Klinische Bedeutung einer Erhöhung
der sauren Serumphosphatase
Dtsch. Med. Wochenschrift 37:
1653-1654 (1970)

48. MODIANO, G.
et al. Studies on red cell acid phosphatase in Sardinia and Rome; absence of correlation with past malarial morbidity
Acta genet. Basel 17: 17 (1967)
49. MONN, E. A new Red Cell Phosphoglucomutase Phenotype in Man
Acta genet. Basel 18: 123-127 (1968)
50. MONN, E. Genetics of the Phosphoglucomutase (PGM) System of Human Red Cells - Family-, Mother-Child and Assesociation-Studies -
Human Heredity 19: 365-374 (1969)
51. MONN, E. Phosphoglucomutase (PGM). Type Determination by Agar gel Elektro-phoresis
Vox Sanguinis 14: 70-78 (1968)
52. MONN, E. Red cell phosphoglucomutase (PGM) types of norwegian lapps (characteristic gene frequencies and varian types)
Human Heredity 19: 264-273 (1969)
53. MONRANT, A.E.
TILIS, D. Phosphoglucomutase frequencies in habanite jews and icelanders
Nature 214: 810 (1967)
54. NAJJAR, V.A. The isolation and properties of phosphoglucomutase
J. Biol. Chem. 175: 281 (1948)
55. NAJJAR, L.F.
PULLMANN, M.E. The Occurence of a Group Transfer Involving Enzyme (phosphoglucomutase and Substrate
Science 119: 631 (1954)

56. OSKI, F.A.
SHABIDI, N.T.
DIAMAND, L.K.
Erythrocyte acid phosphatase mono-
esterase and Glucose 6-Phosphatase
Dehydrogenase Deficiency in
Caucasians
Science 139: 409-411 (1963)
57. PARRINGTON, J.M.
CRUICKSHANK, G.
HOPKINSON, D.A.
ROBSON, E.B.
HARRIS, H.
Linkage relationship between the
three phosphoglucomutase loci
PGM₁, PGM₂, PGM₃
Ann. Hum. genet. 32: 27-34 (1968)
58. PROKOP, O.
In Arndt-Hanser: Frequenzen der
Phosphoglucomutase
Referat gehalten auf der gemeinsa-
men Tagung der Gesellschaft für
forensische Blutgruppennunde e.V.
und der Arbeitsgemeinschaft gericht-
licher Blutgruppensachverständiger
Travemünde 24. - 26. April 1969
59. PROKOP, O.
RADAM, J.
STRAUCH, H.
Die Phosphatasegruppen bei 871
Mutter-Kind-Paaren in Bericht
über die 5. Tagung der Arbeits-
gemeinschaft der Blutgruppensach-
verständigen
Würzburg 1967
60. RACE, R.R.
SANGER, R.
Blutgruppen und Humangenetik
Med. Research Council, Blood Group
Research Unit
The Lister Institute, London 1964
61. RADAM, G.
STRAUCH, H.
Populationsgenetik der sauren
Erythrozytenphosphatase
Humangenetik 2: 378-380 (1966)

62. RADAM, G.
STRAUCH, H.
Elektrophoretische Darstellung
der sauren Erythrozytenphospha-
tase
Z. klin. Chem. 4: 234 (1966a)
63. RADAM, G.
STRAUCH, H.
Schnellwandernde Zonen der sauren
Erythrozytenphosphatase und ihre
Beziehung zu den Phänotypen
Dtsch. Zeitschrift f. gerichtl.
Med. 60: 39-41 (1967)
64. REICH, K.
Der Polymorphismus der sauren
Erythrozytenphosphatase
- Beziehungen zwischen Enzym-
aktivität und Phänotyp -
Dissertation, Hamburg 1968
65. RAPOPORT, S. M.
Medizinische Biochemie
Berlin 1966
66. RENNINGER, W.
Beitrag zum Polymorphismus der
Phosphoglucomutase (PGM)
in Bericht über die 6. Tagung
der Arbeitsgemeinschaft der
Blutgruppensachverständigen
Freiburg 1970
67. RICHTER, O.
Untersuchungen zur Typendiffe-
renzierung der sauren Erythro-
zytenphosphatase
Zeitschrift f. Immunitäts-
forschung
Allergie und kl. Immunologie 131:
267-275 (1967)

68. RICHTER, O. Systematische Altersuntersuchungen der sauren Erythrozytenphosphatase in Bericht über die 6. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Blutgruppensachverständigen Mainz 1968
69. SCHEUPLEIN, B. Qualitative und quantitative Untersuchungen zum genetisch bedingten Polymorphismus der Phosphoglucomutase menschlicher Erythrotypen Dissertation, Hamburg 1968
70. SMERLING, M. Bestimmung der sauren Erythrozytenphosphatase an alten Blutalkoholproben und in Blutspuren in Bericht über die 6. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Blutgruppensachverständigen Mainz 1968
71. SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch-gels:
Group variations in the serum proteins of normal serum proteins of normal human adults
Biochem. J. 61: 629-641 (1955)
72. SMITHIES, O. An improved procedure for starch-gel electrophoresis:
Further variations in the serum proteins of normal individuals
Biochem. J. 71: 585-587 (1958)
73. SPEISER, P.
PANSCH, V. Die saure Erythrozytenphosphatase des Menschen
Wiener klin. Wochenschrift 80: 5-15 (1968)

74. SPENCER, N.
HOPKINSON, D.A.
HARRIS, H. Phosphoglucomutase Polymorphism
in Man
Nature 204: 742-745 (1964)
75. TIESLER, E. Erfahrungen mit der Säulenelektro-
phorese zur Bestimmung der sauren
Erythrozytenphosphatase
in Tagungsbericht der Gesellschaft
für forensische Blutgruppenkunde
e.V. und der Arbeitsgemeinschaft
gerichtl. Blutgruppensachverständi-
ger
Travemünde 1969
76. VALENTINE, W.N.
TANAKA, K.R.
FREDRICKS, R.E. Erythrocyte Acid Phosphatase in
Health and Disease
Americ. J. of Clinical Path. 36:
328-332 (1961)
77. VAN CONG, N.
MOULLES, J. Les types de phosphatase acide
des globules rouges
Etude de 134 familles
Rev. franc. Et. clin. biol. 12:
574-567 (1967)
78. VINCENT, P.
HOLLANDER In Boyer, P.D. Lardy H.,
Myrbaeck K.
"The Inzymes" Bd IV: "Acid Phos-
phatase" Academic Press, New York
(1968)
79. WALTER, H.
BAJATZADEK, M. Studies on the Distribution of
the Human Red Cell Acid Phospha-
tase Polymorphism in Iranians and
other Populations
Acta. genet. Bases 18: 421-428
(1968)

Herrn Prof. Dr. M. Krüpe, apl. Professor an der Universität Marburg/Lahn und Direktor des Staatlichen Medizinalunter-suchungsamtes Fulda, danke ich für die Überlassung des Themas zu dieser Arbeit, die Gewährung uneingeschränkter Arbeitsmöglichkeiten und seinen richtungsweisenden Rat zu den auszuführenden Experimenten und der schriftlichen Niederlegung.

Danken möchte ich auch Herrn Kirchner, dessen praktische Erfahrungen mir eine große Hilfe bei der Versuchsdurch-führung und Dokumentation waren.

Für die Überlassung der Blutproben danke ich Herrn Prof. Dr. K. Müller, Leiter des Bluttransfusionsdienstes und Blutgerinnungslaboratoriums der Universität Marburg, Herrn Prof. Dr. Nieth, Chefarzt des Städtischen Kranken-hauses Fulda, Herrn Prof. Dr. Rind, Leiter der Städtischen Kinderklinik Fulda und Herrn Prof. Dr. Voß, damaliger komm. Leiter der Universitäts-Poliklinik in Marburg.

Lebenslauf

Am 10. Mai 1946 wurde ich als Sohn des Bankdirektors Heinz Schwarz und seiner Ehefrau Rosemarie, geb. Tiemann, in Brackenheim/Württ. geboren.

Vom 6. bis 10. Lebensjahr ging ich in die evangelischen Volksschulen in Essen-Rüttenscheid und Essen-Borbeck. Meine Eltern verlegten ihren Wohnsitz im Herbst 1957 nach Gelsenkirchen-Buer, wo ich den humanistischen Zweig des Max-Planck-Gymnasiums besuchte, das ich Ostern 1966 mit dem Abitur verließ.

Im Sommersemester 1966 begann ich an der Philipps-Universität-Marburg das Studium der Humanmedizin, legte im Wintersemester 1966/67 das Vorphysikum, im Sommersemester 1968 das Physikum ab. Nach meinem ersten klinischen Semester wechselte ich über zur Ludwig-Maximilians-Universität in München, kehrte im Sommer 1970 für ein Semester nach Marburg zurück, um am 1. 10. 1970 das mir vom DAAD verliehene Jahresstipendium in London anzutreten. Nach meiner Rückkunft nach Marburg bereitete ich mich auf das medizinische Staatsexamen vor, das ich am 10. 8. 1972 erfolgreich zum Abschluß brachte.

Mit den Arbeiten zu meiner Promotion war ich seit dem Wintersemester 1969 beschäftigt und schloß den experimentellen Teil im Sommer 1970 ab.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

I. Marburg/Lahn

Die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Braasch, Brück, Buchholz, Dimroth,
Dölle, Exner, Ganz, Golenhofen, Graul, Hardewig, Hensel,
Heuser, Hildebrandt, Hort, Jakob, Karlson, Korb,
Koransky, Krüpe, Linneweh, Mahr, Mann, Martini, Petry,
Pots, Prinz, Rohen, Schleyer, Schmid, Seidel F., Seidel W.,
Siegert, Siess, Straub, Strohmeier, von Stosch, Voss,
Walcher, Wendt, Zilliken.

II. München

Die Herren Professoren und Dozenten:

Dietrich, Dittmann, Eyer, Fikentscher, Herrmann,
Kaiser, Kiese, Langer, Leibbrand-Wettley, Marguth,
Meister, Oberniedermayr, Rueff, Schauer, Schmiedt,
Schwiegk, Spiess, Zenker.

III. London

Die Herren Professoren und Dozenten:

Bannister, Breathnach, Burn, Craig, Grahame-Smith,
Huntingford, Neuberger, Paintin, Peart, Porter,
Williams, Wynn.

